

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-93692

(43)公開日 平成5年(1993)4月16日

(51)Int.Cl.⁵

G 0 1 N 21/76

// C 1 2 Q 1/26

識別記号

庁内整理番号

7235-2J

6807-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 有 請求項の数2(全4頁)

(21)出願番号 特願平3-111619

(22)出願日 平成3年(1991)5月16日

(71)出願人 591102006

財団法人ダム水源地環境整備センター

東京都千代田区麹町2-14-2 麹町NKビル

(72)発明者 軽部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16

(72)発明者 久保 いづみ

東京都豊島区駒込1-6-3

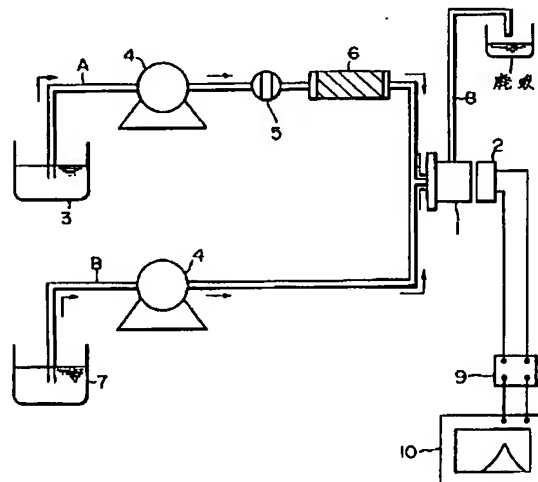
(74)代理人 弁理士 森 哲也 (外2名)

(54)【発明の名称】 リン酸イオン濃度測定装置

(57)【要約】

【目的】水中のリン酸イオン濃度を、他の物質の影響を受けることなく正確に且つリアルタイムに測定できるリン酸イオン濃度測定装置を提供する。

【構成】2つの流路、各流路が合流する化学発光反応部1、発光検出器2、信号増幅器9、および記録計10からなる。第1流路Aは、ビルビン酸と緩衝液とが入った容器3、送液ポンプ4、試料注入口5、およびビルビン酸オキシダーゼを固定した樹脂が充填されたカラム6からなる。第2流路Bは、発光試薬(ルミノール)が入った容器7と送液ポンプ4とからなる。各流路を通液状態にして、リン酸イオンを含む被検査水を試料注入口5より入れると、カラム6においてリン酸イオンとビルビン酸との反応により過酸化水素が生じる。この過酸化水素と化学発光試薬とが化学発光反応部1内で反応して生じる発光量を発光検出器2で検出して、リン酸イオンを定量する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】ビルビン酸とリン酸イオンとを反応させて過酸化水素を生じさせるためのビルビン酸オキシダーゼ固定部に、前記反応により生じる過酸化水素と化学発光試薬とを反応させて発光を生じさせるための化学発光反応部を接続し、この化学発光反応部には前記反応により生じる発光量を検出するための発光検出器を対応させてなることを特徴とするリン酸イオン濃度測定装置。

【請求項2】前記化学発光試薬がルミノールである請求項1記載のリン酸イオン濃度測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、河川や湖沼等の水中のリン酸イオン濃度を測定する方法および装置に関する。

【0002】

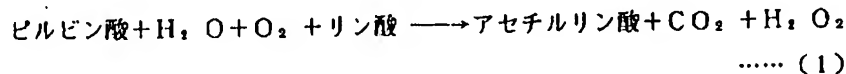
【従来の技術】現在、水質管理上、河川や湖沼等の富栄養化の一因となりうるリンの水中溶存濃度（すなわち、リン酸イオン濃度）を測定することは、重要な作業となっている。従来のリン酸イオン濃度の測定法としては、吸光光度法、原子吸光法、重量法、容量法などの方法が知られている。

【0003】吸光光度法には、モリブドリン酸法、モリブデンブルー法、バナドモリブドリン酸法などがある。これらの方法は、各試薬をリン酸イオンを含む溶液と反応させた後、各反応で生じる特異な吸収波長帯を有する生成物質についてその吸光度をそれぞれの吸収波長帯にて測り、その結果からリン酸イオンを定量する方法である。

【0004】原子吸光法では、リンを直接定量することが困難であるため、リン酸イオンを含む溶液にモリブデン酸塩試薬を加えてリンモリブデン酸アンモニウムとして沈澱させた後に濾過し、得られた沈澱を再び溶解させた溶液からモリブデンを原子吸光で定量することにより、間接的にリン酸イオン濃度を測定している。

【0005】重量法には、マグネシア混液中でリンとマ*

POP



【0012】

【作用】ビルビン酸とリン酸イオンを含む被検査水とがビルビン酸オキシダーゼ固定部に入ると、上記(1)式のビルビン酸オキシダーゼを触媒とした反応が起き、過酸化水素(H_2O_2)が生じる。生じた過酸化水素と化学発光試薬とが化学発光反応部に入ると、発光が起きる。このとき、過酸化水素の生成量に応じた発光量が得られるが、過酸化水素の生成量は被検査水のリン酸イオン濃度に依存している（リン酸イオン1モルに対して過

* グネシウムとによる沈澱を生じさせたのち、焼成してMg、P、O₂を秤量する方法などがある。また、容量法としては、中和滴定やキレート滴定などがある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記各吸光光度法は、各反応で生じる生成物質の特異な吸収波長帯に近似した波長の光を他の物質が吸収するため、その影響を受けたり、感度が不十分であったりして、リン酸イオン濃度の正確な測定値が得られ難いという問題点を有している。

【0007】一方、原子吸光法、重量法、容量法などは正確な定量を行えるが、これらの方法は測定用試料作製や測定操作の煩雑性からリアルタイム測定が難しく、所定水域の水質を即時に把握し、その結果に応じて迅速な対応を行う必要のある水質管理作業には適さない。

【0008】本発明の目的は、被検査水中のリン酸イオン濃度を他の物質の影響を受けることなく正確に且つリアルタイムに測定できるリン酸イオン濃度測定装置を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明のリン酸イオン濃度測定装置は、ビルビン酸とリン酸イオンとを反応させて過酸化水素を生じさせるためのビルビン酸オキシダーゼ固定部に、前記反応により生じる過酸化水素と化学発光試薬とを反応させて発光を生じさせるための化学発光反応部を接続し、この化学発光反応部には前記反応により生じる発光量を検出するための発光検出器を対応させてなることを特徴とする。

【0010】前記化学発光試薬がルミノールであれば好ましい。ビルビン酸オキシダーゼ(EC1.2.3.3)(POP)は、下記(1)式の反応を触媒する酵素であり、ラクトバチルス科(Lactobacillaceae)に属する種々の菌の菌体内に存在している。

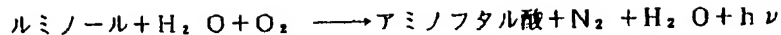
【0011】

【化1】

酸化水素が1モル生成する)ため、この発光量を発光検出器で検出することにより、被検査水に含まれるリン酸イオンの定量ができる。

【0013】ルミノールによる化学発光反応は、下記(2)式に示すように、アルカリ溶液中で過酸化水素などの酸化剤によりルミノールが酸化されて励起状態のアミノフタル酸となり、これが基底状態に戻るときに光を発するものである。

【化2】



..... (2)

【0014】

【実施例】以下、本発明を実施例により詳述するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0015】図1は、本発明のリン酸イオン濃度測定装置の一実施例を示す。この装置は、2つの流路と、化学発光反応部1としてのフローセルと、化学発光反応部1で生じた発光量を検出するための発光検出器2としての

フォトマルチプライヤ（光電子増倍管）とからなる。
【0016】第1流路Aは、容器3、例えばペリスタポンプのような送液ポンプ4、試料注入口5、およびビルビン酸オキシダーゼ固定部6を、この順に送液管で接続して化学発光反応部1に達する。容器3には、ビルビン酸、ビルビン酸オキシダーゼの補酵素、およびビルビン酸オキシダーゼ用の緩衝液が入っている。また、この例では、ビルビン酸オキシダーゼ固定部6として、通常の酵素の固定化に用いられるようなカラム樹脂にビルビン酸オキシダーゼを固定したものが充填されたカラムを用いている。本考案において、ビルビン酸オキシダーゼ固定部6はこのようなカラムに限定されず、例えば、送液管の一部を螺旋状に成形しておき、その螺旋管の内壁にビルビン酸オキシダーゼを固定したものであってもよい。

【0017】第2流路Bは、化学発光試薬が入った容器7と送液ポンプ4とを、この順に送液管で接続して化学発光反応部1に達する。化学発光試薬としては、ルミノールやルミノール誘導体、およびシュウ酸エステル等が用いられる。ルミノールやルミノール誘導体は、アルカリ溶液中で過酸化水素などの酸化剤により酸化されて励起状態のアミノフタル酸またはその誘導体となり、これが基底状態に戻るときに光を発する。この発光反応の触媒としては、ペルオキシダーゼ（ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$ の反応を触媒する酵素）、ヘミン、 Ag^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} などを用いることができる。シュウ酸エステルの場合は、第2の物質（蛍光物質）が必要であり、シュウ酸エステルが過酸化水素と反応して活性中間体を生成し、蛍光物質がこの活性中間体との電荷移動錯体を経て励起され発光する（この発光反応は、「過シュウ酸エステル化学発光反応」と称されているものである）。したがって、容器7には、化学発光試薬の他に発光反応に必要な物質が含まれている。また、化学発光反応部1には廃液管8が接続され、この廃液管8から外部へ廃液を出している。

【0018】発光検出器2には信号増幅器9が接続され、その先に記録計10が接続されている。これにより、化学発光により得られた光の出力が発光検出器2で電気信号に変換された後増幅され、記録される。

【0019】第1流路Aに容器3内の液体を、第2流路

Bに容器7内の液体をそれぞれ送液ポンプ4により常時通せば、発光検出器2の出力電圧が定常状態になる。この状態で試料注入口5よりリン酸イオンを含む被検査水をマイクロシリンジなどで注入すると、この被検査水は送液管内の液体とともにビルビン酸オキシダーゼ固定部6内に入って拡散し、この内部でビルビン酸とリン酸イオンとが反応して過酸化水素が生じる。したがって、ビルビン酸オキシダーゼ固定部6を出た後の送液管から化学発光反応部1へ過酸化水素が入り、この過酸化水素と第2流路Bから化学発光反応部1へ通液されている化学発光試薬とが化学発光反応部1内で反応して発光が生じる。この発光を発光検出器2で捕らえて電気信号に変換し、この信号を信号増幅器9で増幅した後、記録計10に送る。記録計10には出力電圧が記録され、出力電圧は、発光開始により定常状態の値から緩やかに増加してやがて極大値に達し、過酸化水素の全量が反応すれば徐々に減少して最初のレベルに戻る。この発光検出器2からの出力電圧の応答値が、化学発光反応による発光量（すなわち、(1)式の反応による過酸化水素生成量）に相当し、被検査水中のリン酸イオン濃度に比例する。

【0020】この装置により、化学発光試薬としてルミノールを用い、濃度が既知の KH_2PO_4 、試料液のリン酸イオン濃度を測定する実験を行った。容器3には、2 mM（Mはmol/lを表す）ビルビン酸、 10^{-3} Mチアミンピロリン酸と 10^{-7} Mフラビンアデニンジヌクレオチド（ともにビルビン酸オキシダーゼの補酵素）、および0.2 M Tris-maleate緩衝液（pH 7.0）からなる溶液を入れた。容器7には、 $12.5 \mu\text{M}$ ルミノール（予めジメチルスルホキシドにより溶解させたものを使用）、 $10 \mu\text{M}$ p-ヨードフェノール（増感剤）、 1.0 mg/dl ペルオキシダーゼ、および0.2 M Tris-HCl緩衝液（pH 8.5）からなる溶液を入れた。

【0021】第1流路Aに容器3内の液体を、第2流路Bに容器7内の液体を常温でそれぞれ送液ポンプ4により常時通して、発光検出器2の出力電圧を定常状態とした後、試料注入口5より各濃度の KH_2PO_4 、試料液 $100 \mu\text{l}$ をマイクロシリンジで注入した。注入してから記録計10に記録されるまでの時間は2、3分であった。この実験により得られた検量線を図2に示す。このグラフからわかるように、リン酸イオン濃度 $10^{-3} \sim 10^{-7}$ Mの範囲内で、発光検出器2からの出力電圧と実際のリン酸イオン濃度との間に直線関係が認められた。この検量線により、被検査水をこの装置内に注入して得られる発光検出器2からの出力電圧値で、被検査水中のリン酸イオンが定量できる。

【0022】

【発明の効果】以上説明したように、本発明のリン酸イオン濃度測定装置では、ビルビン酸オキシダーゼ固定部内でビルビン酸とリン酸イオンとを反応させ、生じる過酸化水素の全量を発光反応させて得られた発光量を検出することにより、リン酸イオン濃度を測定している。ビルビン酸オキシダーゼは前記過酸化水素生成反応を特異的に触媒するため、他の物質の影響を受けることなく正確にリン酸イオン濃度の測定をすることができる。また、この装置は応答時間（被検査水を注入してから結果が記録されるまでの時間）が短いために、測定作業をリアルタイムに行うことができる。

*【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のリン酸イオン濃度測定装置の一実施例を示す概要図である。

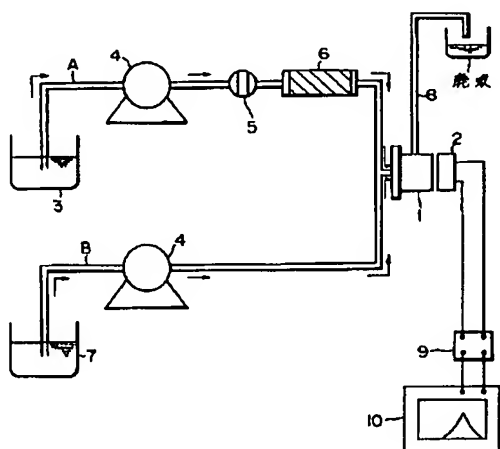
【図2】本発明のリン酸イオン濃度測定装置の一実施例を使用した実験により得られた検量線を示すグラフである。

【符号の説明】

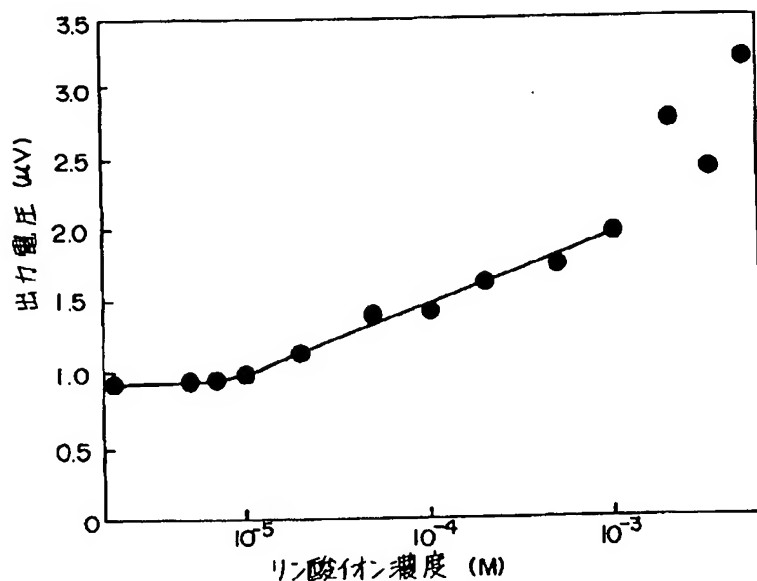
- 1 化学発光反応部
- 2 発光検出器
- 6 ビルビン酸オキシダーゼ固定部

*

【図1】



【図2】



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-093692

(43)Date of publication of application : 16.04.1993

(51)Int.Cl.

G01N 21/76

// C12Q 1/26

(21)Application number : 03-111619

(71)Applicant : DAM SUIGENCHI KANKYO
SEIBI CENTER

(22)Date of filing : 16.05.1991

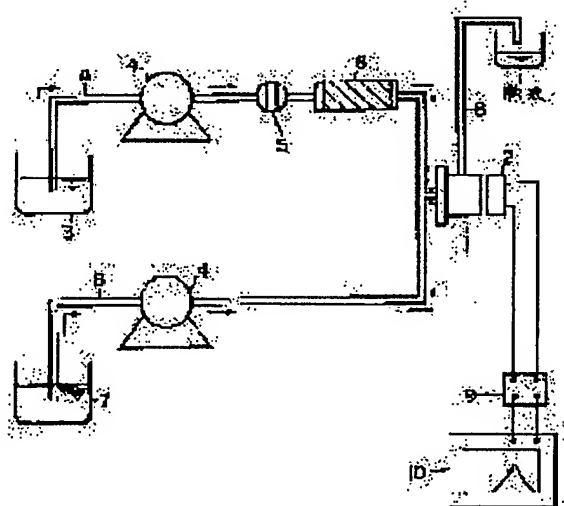
(72)Inventor : KARUBE MASAO
KUBO IZUMI

(54) MEASURING APPARATUS OF CONCENTRATION OF PHOSPHATE ION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a measuring apparatus of concentration of a phosphate ion which can measure the concentration of the phosphate ion in water accurately and on a real time basis without being affected by other substances.

CONSTITUTION: An apparatus comprises two flow passages, a chemiluminescent reaction element 1, a luminescence detector 2, a signal amplifier 9 and a recorder 10. The first flow passage A is constructed of a vessel 3 holding a pyruvic acid and a buffer solution, a liquid supply pump 4, a sample injection port 5 and a column 6 filled up with resin wherein pyruvic acid oxidase is fixed. The second flow passage B is constructed of a vessel 7 holding a luminescent reagent (luminol) and a liquid supply pump 4. When each flow passage is put in a state wherein a liquid flows therethrough and water to be inspected which contains an phosphoric acid ion is injected from the sample injection port 5, hydrogen peroxide is produced by a reaction of the phosphoric acid ion with a pyruvic acid in the column 6. The phosphoric acid ion is determined by detecting the amount of luminescence generated from a reaction of this hydrogen peroxide with the chemiluminescent reagent in the chemiluminescent reaction element 1, by the luminescence detector 2.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 14.06.1991

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 03.10.1995

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2595141

[Date of registration] 19.12.1996

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 07-23773

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 02.11.1995

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.*** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The phosphoric-acid ion-concentration measuring device which connects the chemiluminescence reaction section for making the hydrogen peroxide and the chemiluminescence reagent which are produced by said reaction react to the pyruvate-oxidase fixed part for making a pyruvic acid and phosphoric-acid ion react, and producing a hydrogen peroxide, and making it produce luminescence, and is characterized by to make the luminescence detector for detecting the amount of luminescence produced by said reaction in this chemiluminescence reaction section come to correspond.

[Claim 2] The phosphoric-acid ion concentration measuring device according to claim 1 said whose chemiluminescence reagent is luminol.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the approach and equipment which measure underwater phosphoric-acid ion concentration, such as a river and a lake.

[0002]

[Description of the Prior Art] It is an important activity on current and water quality management to measure the underwater dissolved concentration (namely, phosphoric-acid ion concentration) of Lynn which can serve as a cause of eutrophication, such as a river and a lake. As a measuring method of the conventional phosphoric-acid ion concentration, approaches, such as an absorptiometry, an atomic absorption method, a weight method, and a volumetric method, are learned.

[0003] There are a molybdophosphoric-acid method, the MORIBUN DIN blue method, a BANADO molybdophosphoric-acid method, etc. in an absorptiometry. These approaches are the approaches of measuring the absorbance in each absorption wavelength range about the quality of a product which has the unique absorption wavelength range produced at each reaction, and carrying out the quantum of the phosphoric-acid ion from the result, after making each reagent react with the solution containing phosphoric-acid ion.

[0004] Since it is difficult to carry out the direct quantum of Lynn in an atomic absorption method, it filtered, after adding the molybdate reagent to the solution containing phosphoric-acid ion and making it precipitate as ammonium phosphomolybdate, and phosphoric-acid ion concentration has been indirectly measured by carrying out the quantum of the molybdenum at atomic absorption from the solution in which the obtained precipitation was dissolved again.

[0005] It calcinates, after making a weight method produce precipitation by Lynn and magnesium in magnesia mixture, and it is $Mg_2P_2O_7$. There is the approach of carrying out weighing capacity etc. Moreover, there are a neutralization titration, chelatometry, etc. as a volumetric method.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, each above-mentioned absorptiometry has the trouble that it is influenced [the], or sensibility is inadequate, and measured value with exact phosphoric-acid ion concentration is hard to be obtained, in order that other matter may absorb the light of the wavelength approximated to the

unique absorption wavelength range of the quality of a product produced at each reaction.

[0007] On the other hand, although an atomic absorption method, a weight method, a volumetric method, etc. can perform an exact quantum, the complicated nature of test sample production or measurement actuation to real-time measurement is difficult for these approaches, the water quality of a predetermined water area is grasped immediately, and it is not suitable for a water quality management activity with the need of performing a prompt action according to the result.

[0008] The purpose of this invention is to offer the phosphoric-acid ion concentration measuring device which can measure inspected underwater phosphoric-acid ion concentration on real time correctly [without being influenced of other matter].

[0009]

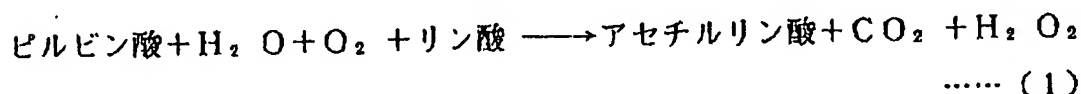
[Means for Solving the Problem] The phosphoric-acid ion-concentration measuring device of this invention connects the chemiluminescence reaction section for making the hydrogen peroxide and the chemiluminescence reagent produced by said reaction react to the pyruvate-oxidase fixed part for making a pyruvic acid and phosphoric-acid ion react, and producing a hydrogen peroxide, and making it produce luminescence, and is characterized by to make the luminescence detector for detecting the amount of luminescence produced by said reaction come to correspond to this chemiluminescence reaction section.

[0010] It is desirable if said chemiluminescence reagent is luminol. The pyruvate oxidase (EC1.2.3.3) (POP) is an enzyme which carries out the catalyst of the reaction of following the (1) type, and exists in the fungus body of the various bacilli belonging to the department (Lactobacillaceae) of Lactobacillus.

[0011]

[Formula 1]

POP

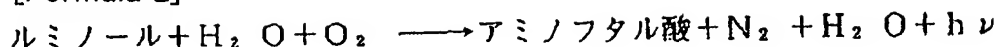


[0012]

[Function] If a pyruvic acid and the inspected water containing phosphoric-acid ion go into a pyruvate-oxidase fixed part, the reaction which made the catalyst the pyruvate oxidase of the above-mentioned (1) formula will occur, and a hydrogen peroxide (H₂O₂) will arise. If the hydrogen peroxide and chemiluminescence reagent which were produced go into the chemiluminescence reaction section, luminescence will occur. Although the amount of luminescence according to the amount of generation of a hydrogen peroxide is obtained at this time, since it is dependent on the phosphoric-acid ion concentration of inspected water (a hydrogen peroxide generates one mol to one mol of phosphoric-acid ion), the amount of generation of a hydrogen peroxide can do the quantum of the phosphoric-acid ion contained in inspected water by detecting this amount of luminescence with a luminescence detector.

[0013] The chemiluminescence reaction by luminol emits light, when luminol oxidizes with oxidizers, such as a hydrogen peroxide, in an alkali solution, it becomes the amino phthalic acid of an excitation state and this returns to a ground state, as shown in following the (2) type.

[Formula 2]



..... (2)

[0014]

[Example] Hereafter, although this invention is explained in full detail according to an example, this invention is not limited to this.

[0015] Drawing 1 shows one example of the phosphoric-acid ion concentration measuring device of this invention. This equipment consists of two passages, a flow cell as the chemiluminescence reaction section 1, and a photomultiplier (photomultiplier tube) as a luminescence detector 2 for detecting the amount of luminescence produced in the chemiluminescence reaction section 1.

[0016] The 1st passage A connects a container 3 4, for example, a liquid-sending pump like a peristaltic pump, the sample inlet 5, and the pyruvate-oxidase fixed part 6 to this order with liquid-sending tubing, and reaches the chemiluminescence reaction section 1. A pyruvic acid, the coenzyme of the pyruvate oxidase, and the buffer solution for pyruvate oxidase are contained in the container 3. Moreover, the column with which what fixed the pyruvate oxidase to column resin which is used for immobilization of the usual enzyme as a pyruvate-oxidase fixed part 6 was filled up with this example is used. In this design, the pyruvate-oxidase fixed part 6 is not limited to such a column, for example, fabricates some liquid-sending tubing spirally, and may fix the pyruvate oxidase to the wall of the helical traveling wave tube.

[0017] The 2nd passage B connects the container 7 and the liquid-sending pump 4 containing a chemiluminescence reagent to this order with liquid-sending tubing, and reaches the chemiluminescence reaction section 1. Luminol, a luminol derivative, an oxalate, etc. are used as a chemiluminescence reagent. Luminol and a luminol derivative oxidize with oxidizers, such as a hydrogen peroxide, in an alkali solution, turn into an amino phthalic acid of an excitation state, or its derivative, and when this returns to a ground state, they emit light. As a catalyst of this luminous reaction, a peroxidase (enzyme which carries out the catalyst of the reaction of $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$), hemin, Ag^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , nickel $^{2+}$, etc. can be used. In the case of an oxalate, the 2nd matter (fluorescent material) is required, an oxalate reacts with a hydrogen peroxide, activity intermediate field are generated, and a fluorescent material is excited through an electron donor acceptor complex with this activity intermediate field, and emits light (this luminous reaction is called the "fault oxalate chemiluminescence reaction"). Therefore, the matter required for the luminous reaction other than a chemiluminescence reagent is contained in the container 7. Moreover, the waste fluid tubing 8 is connected to the chemiluminescence reaction section 1, and waste fluid is taken out from this waste fluid tubing 8 to the exterior.

[0018] The signal amplifier 9 is connected to the luminescence detector 2, and the recorder 10 is connected to the point. It is amplified after the output of the light obtained by chemiluminescence is changed into an electrical signal with the luminescence detector 2 by this, and it is recorded.

[0019] About the liquid in a container 3, if it always lets the liquid in a container 7 pass with the liquid-sending pump 4 to the 1st passage A at the 2nd passage B, respectively, the output voltage of the luminescence detector 2 will be in a steady state in it. If the

inspected water which contains phosphoric-acid ion from the sample inlet 5 in this condition is poured in by a micro syringe etc., with the liquid in liquid-sending tubing, it will enter in the pyruvate-oxidase fixed part 6, and will be spread, a pyruvic acid and phosphoric-acid ion will react in this interior, and a hydrogen peroxide will produce this inspected water. Therefore, a hydrogen peroxide goes into the chemiluminescence reaction section 1 from liquid-sending tubing after coming out of the pyruvate-oxidase fixed part 6, this hydrogen peroxide and the chemiluminescence reagent currently dipped from the 2nd passage B to the chemiluminescence reaction section 1 react within the chemiluminescence reaction section 1, and luminescence arises. After catching this luminescence with the luminescence detector 2, changing into an electrical signal and amplifying this signal with the signal amplifier 9, it sends to a recorder 10. Output voltage is recorded on a recorder 10, and if it increases from the value of a steady state gently by luminescence initiation, the maximal value is reached soon and the whole quantity of a hydrogen peroxide reacts, output voltage will decrease gradually and will return to the first level. The response value of the output voltage from this luminescence detector 2 is equivalent to the amount of luminescence by the chemiluminescence reaction (namely, the amount of hydrogen-peroxide generation by the reaction of (1) type), and proportional to inspected underwater phosphoric-acid ion concentration.

[0020] With this equipment, luminol is used as a chemiluminescence reagent, and concentration is known KH_2PO_4 . The experiment which measures the phosphoric-acid ion concentration of a sample solution was conducted. 2mM (M expresses mol/l) pyruvic acid, 10-3M thiamin diphosphate, 10-7M flavin adenine dinucleotide (both coenzyme of the pyruvate oxidase), and the solution that consists of the 0.2 MTris-malate buffer solution (pH7.0) were put into the container 3. 12.5microM luminol (what was beforehand dissolved with dimethyl sulfoxide is used), the 10microMp-iodine phenol (sensitizer), the 1.0 mg/dl peroxidase, and the solution that consists of the 0.2 MTris-HCl buffer solution (pH8.5) were put into the container 7.

[0021] It is KH_2PO_4 of each concentration from the sample inlet 5 after always letting the liquid in a container 7 pass for the liquid in a container 3 with the liquid-sending pump 4 in ordinary temperature to the 2nd passage B; respectively and making output voltage of the luminescence detector 2 into a steady state in the 1st passage A. 100micro of sample solutions I was poured in by the micro syringe. Time amount after pouring in until it is recorded on a recorder 10 was 2 or 3 minutes. The calibration curve acquired by this experiment is shown in drawing 2. Straight-line relation was accepted between the output voltage from the luminescence detector 2, and actual phosphoric-acid ion concentration within the limits of phosphoric-acid ion concentration 10-5-10-3M so that this graph might show. The quantum of the inspected underwater phosphoric-acid ion can be carried out in the output voltage value from the luminescence detector 2 which pours in inspected water into this equipment and is obtained by this calibration curve.

[0022]

[Effect of the Invention] As explained above, in the phosphoric-acid ion concentration measuring device of this invention, phosphoric-acid ion concentration is measured by making a pyruvic acid and phosphoric-acid ion react within a pyruvate-oxidase fixed part, and detecting the amount of luminescence which was made to carry out the luminous reaction of the whole quantity of the hydrogen peroxide to produce, and was obtained. Since the pyruvate oxidase carries out the catalyst of said hydrogen-peroxide generation

reaction specifically, it can measure phosphoric-acid ion concentration correctly, without being influenced of other matter. Moreover, since this equipment has the short response time (time amount after pouring in inspected water until a result is recorded), measurement can be carried out to real time.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the schematic diagram showing one example of the phosphoric-acid ion concentration measuring device of this invention.

[Drawing 2] It is the graph which shows the calibration curve acquired by the experiment which used one example of the phosphoric-acid ion concentration measuring device of this invention.

[Description of Notations]

1 Chemiluminescence Reaction Section

2 Luminescence Detector

6 Pyruvate-Oxidase Fixed Part

[Translation done.]